



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

**0 115 613
A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: 83112812.9

⑳ Anmeldetag: 20.12.83

⑤ Int. Cl.: **C 12 N 15/00, C 12 P 21/02,
C 07 H 21/04**

③① Priorität: 24.12.82 DE 3247922

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 15.08.84
Patentblatt 84/33

④④ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE

⑦① Anmelder: Boehringer Ingelheim International G.m.b.H.,
D-6507 Ingelheim am Rhein (DE)

⑦② Erfinder: Dworking, Marc-Bruce, Dr., 90 Morning-Side
Drive Apt. 6/J, New York, NY 10027 (US)
Erfinder: Dworkin-Rastl, Eva, Dr., 90 Morning Side Drive
Apt. 6/J., New York, NY 10027 (US)
Erfinder: Adolf, Günther, Dr., Johannagasse 20/7,
A-1120 Wien (AT)
Erfinder: Hauer, Norbert, Dr. Dipl.-Chem.,
Händlerstrasse 12, D-7950 Biberach 1 (DE)
Erfinder: Melndl, Peter, Dr., Hockegasse 63/1,
A-1120 Wien (AT)
Erfinder: Swetty, Peter, Dr., Hietzinger
Hauptstrasse 40 B/9, A-1130 Wien (AT)
Erfinder: Hauptmann, Rudolf, Dr., Viktorgasse 25/8,
A-1040 Wien (AT)

⑤④ DNA-Sequenzen, deren Herstellung, diese Sequenzen enthaltende Plasmide und deren Verwendung zur Synthese
eukaryotischer Genprodukte in Prokaryoten.

⑤⑦ Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Kombination der Promotor/Operator-Region des Tryptophanoperons von *Serratia marcescens* mit einer synthetischen Ribosomenbindungssequenz, ein diese Sequenz enthaltendes Expressionsplasmid, in welchem anschließend an die obige Sequenz die einzige Hin dIII-Spaltstelle des Plasmids liegt, in die das zur Expression zu bringende Gen eingefügt werden kann, sowie Produktionsplasmide zur Expression eukaryotischer Genprodukte in Prokaryoten, insbesondere zur Herstellung von Leukocyteninterferon.

EP 0 115 613 A2

Boehringer Ingelheim International GmbH
6507 Ingelheim/Rhein

Case 12/003
Dr. Fl./Kp.
Auslandstext

5 DNA-Sequenzen, deren Herstellung, diese Sequenzen
 enthaltende Plasmide und deren Verwendung zur
 Synthese eukaryotischer Genprodukte in
 Prokaryoten

10 Eine Voraussetzung für die Expression von Genen in Bakterien
 ist das Vorhandensein eines sogn. Promotors, einer Erken-
 nungssequenz für die Bindung der bakteriellen RNA-Polymera-
 se. Ein Promotor ermöglicht also die Transkription der
 stromabwärts gelegenen Sequenzen. Gene, deren Produkte je-
 derzeit synthetisiert werden, haben Promotoren, die immer
 zur Bindung von RNA-Polymerase-Molekülen fähig sind. Andere
15 Gene bzw. Operons der Bakterien sind reguliert, d.h. ihr
 Promotor kann durch bestimmte Mechanismen zugänglich oder
 unzugänglich gemacht werden.

20 Eine weitere Voraussetzung für die Synthese der gewünschten
 Genprodukte ist eine effiziente Translation der RNA-Trans-
 kripte an den bakteriellen Ribosomen. So wurde von Shine und
 Dalgarno (siehe Nature 254, 34-38 (1975)) gezeigt, daß in
 Bakterien die Nukleotidsequenz am 5'-Ende der mRNA für deren
 Bindung ans Ribosom verantwortlich ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine DNA-Sequenz der Formel

CGGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTA
CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCGA
—Promotor/Operator— * —RBS—→

15 ,welche gegebenenfalls anschließend an die Ribosomenbin-
dungssequenz eine Linkersequenz enthält. Diese Sequenz stellt
eine neue Kombination aus einer literaturbekannten
Promotorsequenz und einer literaturbekannten Ribosomenbin-
dungssequenz dar.

Ein bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist jedoch die DNA-Sequenz der Formel

5' AATTCACGCTGATCGCTAA AACATTGTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAA CACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG
 ← Promotor →
GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAGCT
25 CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCGA
 ← Promotor/Operator → *RBS →
TAAAGATG
ATTTCTAC
← Linker →

sowie die neue Linkersequenz der Formel

5' AGCTTAAAGATG

3' ATTTCTAC.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die
5 diese Sequenzen enthaltenden Expressionsplasmide, in denen
anschließend an die obigen Sequenzen die einzige Hin dIII-
Spaltstelle der Plasmide folgt, in die zur Herstellung der
Produktionsplasmide das jeweilige gewünschte Gen eingesetzt
werden kann, und die Verwendung der so hergestellten Produk-
10 tionsplasmide zur Herstellung eukaryotischer Genprodukte in
Prokaryoten, insbesondere zur Herstellung von Leukocyten-
interferon.

Zur Erreichung des erfindungsgemäßen Zieles wird beispiels-
weise wie folgt verfahren:

15 Auswahl einer geeigneten bakteriellen Promotorsequenz:

Hierzu wird vorzugsweise ein Promotor verwendet, der, in
Kombination mit einer Operatorsequenz, induzierbar bzw. re-
primierbar ist. Ein derartiger Promotor hat den Vorteil, daß
die Synthese des gewünschten bakterienfremden Proteins erst
20 in einer späten Phase des bakteriellen Wachstumszyklus ange-
schaltet werden kann, z.B. im Falle des Tryptophanoperons
(siehe Hallewell und Emtage in Gene 9, 27-47 (1980)) durch
Entzug von Tryptophan aus dem Kulturmedium und durch Zugabe
von Indol-(3)-acrylsäure als Induktor des Tryptophanoperons
25 zum Kulturmedium, und somit die Vermehrung der Bakterien
nicht beeinflußt. Zweckmäßigerweise wird zur Konstruktion
des Expressionsplasmides das sehr starke und regulierbare
literaturbekannte Promotor/Operator-System des Tryptophan-
operons von *Serratia marcescens* (siehe Miozzari und Yanofsky
30 in Nature 276, 684-689 (1978)) der Formel

- 4 -

5' AATTCACGCTGATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
 3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

— K — Promotor —

5' GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGG
 CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCC

— Promotor/Operator —> -

verwendet. Dieses erhält man nach literaturbekannten Verfahren.

Konstruktion der Ribosomenbindungssequenz:

- 10 Hierzu wird die als besonders wirksam beschriebene Sequenz der Formel

5' TAAGGAGGTTTA

(siehe von Jay et al. in Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 5543-5548 (1981)) verwendet.

- 15 Die Konstruktion der Ribosomenbindungssequenz der Formel

12mer
 5' TAAGGAGGTTTA
 3' ATTCCTCAAATTCGA
 6mer 10mer

- 20 erfolgt vorzugsweise durch Zusammenbau der 3 synthetischen Oligonucleotiden der Formeln

6mer
 5' TCCTTA,
 10mer
 5' AGCTTAAACC und
 12mer
 5' TAAGGAGGTTTA

nach literaturbekannten Methoden, wobei vorher zweckmäßigerweise das 6mer Oligonucleotid radioaktiv markiert wird.

Die anschließende Verknüpfung des Promotor/Operators mit der Ribosomenbindungssequenz erfolgt nach literaturbekannten Verfahren.

Konstruktion des Expressionsplasmides:

Aus einem Plasmid, z.B. dem Plasmid pBP 101, das einen Teil des Tryptophanoperons von *Serratia marcescens* enthält, wird die 90 bp lange Promotor-/ Operator-Sequenz mit Hilfe der Restriktionsenzyme Eco RI und Hae III herausgeschnitten. Dieses Fragment wird hierauf mit der synthetisch hergestellten RBS mit Hilfe des Enzymes DNA-Ligase verknüpft, und das so hergestellte Promotor-/ Operator-RBS-Fragment, das ein Eco RI- Ende vor dem Promotor/Operator und ein Hin dIII- Ende nach der RBS enthält, wird in das Plasmid pBR 322 eingesetzt, anstelle des plasmideigenen 29 bp langen Eco RI-Hin dIII-Fragmentes. Die Wirksamkeit des so konstruierten Expressionsplasmides (pER 103) im Hinblick auf Expression von in die Hin dIII-Spaltstelle eingebauten Genen wird am Beispiel von Leukocyteninterferon, Subtyp A (IFN- α A) gezeigt.

Expression von IFN- α A in pER 103:

Interferon wird in menschlichen Zellen, wie andere zum Export bestimmten Proteine auch, als Präprotein synthetisiert, d.h. als Protein mit einer Leadersequenz. Diese Leadersequenz wird erst beim Austritt des Proteinmoleküles aus der Zelle von einem darauf spezialisierten Enzym abgespalten, wodurch die reife Form des Proteins erzeugt wird. Eine Möglichkeit, reifes Interferon von Bakterien synthetisieren zu lassen, ist eine Entfernung der Leadersequenz auf der DNA-Ebene, d.h. die Konstruktion eines Gens, das nur für die Sequenzen des reifen Proteins codiert.

Konstruktion des Interferonproduktionsplasmides für IFN- α A:

Beispielsweise hat Leukocyteninterferon eine Präsequenz von 23 Aminosäuren, darauf folgt ein Cystein, welches, nach Spaltung des Präinterferons, die erste Aminosäure des

5 "reifen" Interferonpolypeptids darstellt. Zur Konstruktion von Plasmiden, die in Bakterien die Synthese von reifem Interferon ermöglichen sollten, ist es notwendig, ein Fragment des Interferogens zu isolieren, das exakt mit dem Codon für dieses Cystein beginnt. Vor dieses Cysteincodon

10 muß dann ein ATG-Methionincodon gesetzt werden, um die Initiation der Proteinsynthese zu ermöglichen. Diese Konstruktion wird dann in geeigneter Weise beispielsweise in das Expressionsplasmid pER 103 eingesetzt, so daß der Abstand zwischen ATG-Initiationscodon und RBS für die Translation

15 optimal ist. Interferon, das mit Hilfe eines solchen Plasmides in Bakterien hergestellt wird, besitzt die Aminosäuresequenz des reifen Polypeptids plus ein zusätzliches Methionin an dessen NH₂-terminalen Ende.

Das für IFN- α A codierende Interferonproduktionsplasmid pER

20 33 wird erfindungsgemäß beispielsweise nach diesen Grundsätzen konstruiert (seine Herstellung ist in Fig. 4 schematisch wiedergegeben):

- a) Konstruktion des für reifes Interferon codierenden Gens, mit Ausnahme des Codons für das NH₂-terminale Cystein:

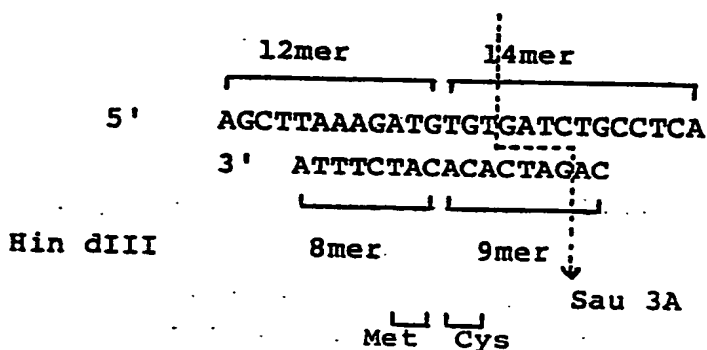
25 Als Ausgangsmaterial für die Interferoninformation dient beispielsweise der für IFN- α A codierende cDNA-Klon 1 F7, welcher am 17. Mai 1982 unter der DNS-Nummer 2362 bei der Hinterlegungsstelle "Deutsche Sammlung von Mikro-

30 Organismen, Griesebachstraße 8, D 3400 Göttingen (Bundesrepublik Deutschland)" hinterlegt wurde (siehe auch Deutsche Patentanmeldung P 32 20 116.8 vom 28.05. 1982).

Er enthält das Interferongen insertiert in die Pst I-Spaltstelle von pBR 322. IFN- α A (wie auch andere Leukocyteninterferon-Subtypen) weist eine Spaltstelle für Sau 3A gleich nach dem für das NH_2 -terminale Cystein codierenden TGT auf. Die Existenz dieser Spaltstelle bildet die Grundlage für die verwendete Methode zur Konstruktion eines "reifen" Interferogens aus geeigneten Restriktionsfragmenten, z.B. aus dem interferonspezifischen 646 bp Ava II-Fragment und dem 34bp-Sau 3A-Ava II-Fragment des Plasmides 1 F7.

b) Herstellung des Oligonukleotid-Komplexes:

Zu dem so konstruierten Gen muß nun am 5'-Ende das fehlende Cysteinocodon und, davor, ein ATG-Methionincodon hinzugefügt werden; weiters ist ein Verbindungsstück notwendig, das die Ligierung dieser Konstruktion in die Hin dIII-Spaltstelle des Expressionsplasmids pER 103 ermöglicht. Zu diesem Zweck werden 4 Oligonukleotide synthetisiert: ein 14mer 5' TGTGATCTGCCTCA, ein 12mer 5' AGCTTAAAGATG, ein 9mer 5' CAGATCACA und ein 8mer 5' CATCTTTA. Diese Oligonukleotide sollen, nach Ligierung und einem Sau 3A-Nachschnitt, das gewünschte Fragment darstellen, das den Interferongen-Teil (Sau 3A-Ende) mit pER 103 (Hin dIII-Ende) verbinden kann:



Erfindungsgemäß werden die Oligonukleotide so konstruiert, daß sich der Initiations-Codon ATG und der Cystein-Codon TGT auf separaten Fragmenten befinden. Dieses ermöglicht eine generelle Verwendung von 12mer (und 8mer) bei der Insertion von Genen in pER 103. Das Oligonukleotid mit dem Cystein-Codon muß daher mindestens 9 Nukleotide lang sein. Beispielsweise können folgende Nukleotide verwendet werden:

5' TGTGATCTG,
5' TGTGATCTGC,
5' TGTGATCTGCC,
5' TGTGATCTGCCT oder
5' TGTGATCTGCCTC.

So wird beispielsweise das mit dem 14mer erhaltene ligierte Oligonukleotid mit Sau 3A verdaut, um das ins Interferongen passende Sau 3A-Ende zu erzeugen.

Die anschließende Verknüpfung von Interferongen und Oligonukleotid-Komplex, die Ligierung in ein Plasmid und dessen Transformation in einen bakteriellen Wirt, z.B. wie *Escherichia coli* HB 101, erfolgt nach literaturbekannten Verfahren.

Zur Erzielung einer weiteren Ausbeutesteigerung bei der Herstellung eukaryotischer Genprodukte kann es ferner von Vorteil sein, wenn das diesbezügliche Produktionsplasmid die für die Expression erforderlichen DNA-Sequenzen mehrfach, z.B. doppelt, enthält, beispielsweise zwei komplette Gene für reifes Interferon αA inklusive der bakteriellen, regulatorischen Sequenzen. Hierzu wird das mit einem bakteriellen Promotor, einer prokaryotischen, ribosomalen Bindungsstelle und eine ATG-Initiationscodon versehene Gen für reifes Interferon aus einem erfindungsgemäß hergestellten Produktionsplasmid, z.B. aus pER 33, isoliert und nach Veränderung eines der beiden Enden dieses DNA-Stückes in ein mit einem Restriktionsenzym, z.B. EcoRI, erfindungsgemäß hergestellten linearisierten, vollständigen gleichen Plasmid eingefügt.

Ferner ist es von Vorteil, wenn ein so erfindungsgemäß hergestelltes Tryptophanoperon tragendes Plasmid wie z.B. das Plasmid pER 33 einen par-Lokus enthält, das heißt eine DNA-Sequenz, welche bei Abwesenheit eines Selektionsdruckes, z.B. durch ein Antibiotikum wie Ampicillin, während des Bakterienwachstums für die gleichmäßige Weitergabe von Plasmiden in Tochterzellen verantwortlich ist (siehe P.M. Meacock, S.N. Cohen in Cell 20, 529-542 (1980)). Hierzu wurde der par-Lokus zunächst aus dem Plasmid pPM 31, welches in der vorstehend genannten Literaturstelle beschrieben wird, isoliert und in ein erfindungsgemäß hergestelltes Interferonproduktionsplasmid eingebracht.

Durch die vorliegende Erfindung ist es somit gelungen, ein Expressionsplasmid zu konstruieren, das die Promotor-/Operator-Region des Tryptophan-Operons von *Serratia marcescens*, sowie eine synthetische RBS enthält. Die Wirksamkeit dieser Konstruktion zur gentechnologischen Produktion von bakterienfremden Proteinen wurde am Beispiel von Leukocyteninterferon gezeigt.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

A. Beschreibung der allgemeinen Methoden:

1. Restriktionsenzymverdauungen

Restriktionsendonukleasen, beispielsweise der Firma Bethesda Research Laboratories, wurden unter folgenden Bedingungen verwendet:

Eco RI-, Hin dIII-, Pst I- und Ava II-Verdauungen wurden in TA-Puffer durchgeführt (33 mM Tris-Acetat, pH 7,9, 66 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 100 µg/ml BSA);

Hae III-Verdauungen wurden in TM-Puffer durchgeführt (70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM MgCl₂);

Sau 3A-Verdauungen wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 75 mM NaCl durchgeführt.

2. Plasmidpräparation, Gelelektrophorese

Plasmide wurden von 1,5 ml - oder von 100-300 ml - Übernacht-Kulturen in L-Broth + 25 µg/ml Tetracyclin oder + 100 µg/ml Ampicillin nach der Vorschrift von Birnboim und Doly (siehe Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)) präpariert. Weitere Reinigung der Plasmide erfolgte durch Isopropanolfällungen (siehe unten) und (bei großen Ansätzen) durch Chromatographie an Sepharose 4B der Firma Pharmacia. Größere Mengen Plasmide (von 1-6 Liter Kultur) wurden nach der "cleared lysate"-Methode von Clewell und Helsinki (siehe Biochemistry 9, 4428-4440 (1970)) aufgearbeitet, wobei anschließend daran eine Ethidiumbromid- CsCl-Gradientenzentrifugation durchgeführt wurde.

Elektrophorese von Plasmiden bzw. deren Restriktionsverdauungsprodukten erfolgte in 0,8 - 1,4 % Agarosegelen oder in 6 % Polyacrylamidgelen, in 40 mM Tris-Acetat, pH 7,8, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA. Präpara-

tion von Restriktionsfragmenten erfolgte durch Ausschneiden des das gewünschte Fragment beinhaltenden Gelstückchens und elektrophoretische Elution der DNA aus dem Gel in einen Dialysenschlauch.

3. Kinase- und Phosphatasereaktionen, Ligasereaktionen

5'-Phosphorylierungsreaktionen (Endmarkierungen) wurden in TM-Puffer (70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM $MgCl_2$) + 5 mM DTT + 0,2-0,5 mM ATP (10-20 μCi ^{32}P -ATP) mit 5 Einheiten T4-Polynukleotidkinase, erhältlich von der Firma Bethesda Research Laboratories, 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Hierauf wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren.

Ligasereaktionen wurden in TM-Puffer + 5 mM DTT + 0,25 mM ATP mit 0,1 Einheiten T4-DNA-Ligase, erhältlich von der Firma Bethesda Research Laboratories (bei "blunt-end"-Ligierungen), bzw. 0,005 Einheiten Ligase (Ligierungen von kohäsiven Enden) über Nacht bei 14°C durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym 10 Minuten bei 70°C denaturiert.

Aufeinanderfolgende Kinase- und Ligasereaktionen wurden im selben Reaktionsgemisch durchgeführt. Nach Hitzedenaturierung des ersten Enzyms wurden wieder 5 mM DTT und 0,25-0,5 mM ATP zugegeben und die zweite Reaktion angeschlossen.

Phosphatasereaktionen wurden im Restriktionsverdauungspuffer (üblicherweise TA-Puffer) durchgeführt, durch Zugabe von 1 Einheit alkalischer Phosphatase (hergestellt von der Firma Sigma aus Kälberdarm) zu einer Restriktionsverdauung und Inkubation 15 Minuten bei 37°C. Daran wurden 1-2 Phenolextraktionen, eine


- 12 -

Ätherextraktion und eine Alkoholfällung angeschlossen. Oft wurden hierauf die DNA-Fragmente noch elektrophoretisch aufgetrennt und geleluert, bevor weitere Manipulationen durchgeführt wurden.

5 Um große DNA-Fragmente (500 bp und größer) von kleinen Fragmenten (Linkerfragmenten, die nicht ligiert hatten, oder kleinen Restriktionsverdauungsprodukten) abzutrennen, wurden Isopropanolfällungen durchgeführt: Die Reaktion wurde mit 2N NH_4 -Acetat (Endkonzentration) versetzt und mit 0,6 Volumen Isopropanol 10-20 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation 5 Minuten in einer Eppendorffzentrifuge wurde der Überstand entfernt, die Fällung mit kaltem 70% Äthanol gewaschen, nochmals zentrifugiert; das 15 daraus resultierende Pellet wurde getrocknet und war für weitere Manipulationen bereit.

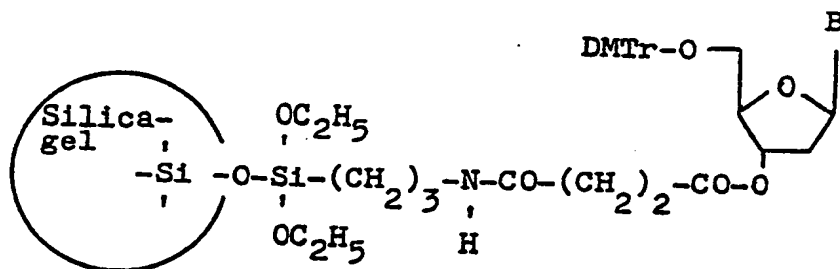
B. Herstellung der Oligonukleotide:

Legende:

DMTr	=	p,p'-Dimethoxy-triphenylmethyl
ibu	=	Isobutyryl
bz	=	Benzoyl (am Basenstickstoff)
	=	polymeres Trägermaterial
B	=	Thymin oder N ² -Isobutyrylguanin oder N ⁴ -Benzoylcytosin oder N ⁶ -Benzoyladenin
THF	=	Tetrahydrofuran

Beispiel IFunktionalisierung des polymeren Trägermaterials

Die Funktionalisierung des polymeren Trägermaterials erfolgte nach literaturbekannten Verfahren. Als Trägermaterial diente HPLC-Silicagel (Macherey 5 Nagel, Korngröße 20 µm, Porengröße 200 Å). Es wurde derivatisiert wie bei Matteucci und Caruthers beschrieben, mit der Ausnahme, daß der Succinylierungsschritt mit Bernsteinsäureanhydrid in wasserfreiem Pyridin durchgeführt wurde (siehe M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 21, 719 (1981)), J. Am. chem. Soc. 103, 3185 (1981) und auch T. Tanaka, R.L. Letsinger, Nucleic Acids Research 10, 3249 (1982)). Die geschützten Nucleoside wurden so entsprechend folgendem Formelbild kovalent mit dem Silicalgel verknüpft:



Die Belastungsdichte betrug zwischen 68 und 104 µMol Nucleosid pro g Trägermaterial.

Beispiel II5'-Dimethoxytrityl-desoxythymidin-3'-chlormethoxyphosphit

Die voll geschützten Nucleosid-3'-chlormethoxyphosphite wurden nach literaturbekannten Verfahren synthetisiert (M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, J. Am. Chem. 103, 3185 (1981) und T. Tanaka, R.L. Letsinger, Nucleic Acids Research 10, 3249 (1982)).

- 544,6 mg (1,0 mMol) 5'-Dimethoxytrityl-thymidin (DMTrdT) wurden in 1,0 ml absolutem THF gelöst und diese Lösung bei -78°C innerhalb 15 Minuten unter Argon tropfenweise zu einer gerührten Lösung von 0,9 mMol Methyl-dichlorphosphit in 0,5 ml absolutem Pyridin und 2,0 ml absolutem THF gegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette in einen trockenen, mit Argon gefüllten Schliffkolben (25 ml) überführt. Bei Raumtemperatur wurde unter Vakuum das Lösungsmittel abgezogen, danach je 0.5 ml Toluol und THF hinzugegeben und erneut eingedampft, wobei als Produkt ein farbloser schaumiger Feststoff zurückblieb. Dieses Produkt wurde nicht auf seine Reinheit hin analysiert, sondern in 10,0 ml absolutem Pyridin gelöst und diese Lösung unter Argon bei -20°C bis zur weiteren Verwendung, maximal jedoch eine Woche lang, aufbewahrt.

Beispiel III

5'-Dimethoxytrityl-N²-isobutyryl-desoxyguanosin-3'-chlor-methoxy-phosphit

- 20 Analog Beispiel II wurde eine Lösung dieses Nucleosidphosphoro-chloridits in 10,0 ml Pyridin aus 640,0 mg (1,0 mMol) 5'-Dimethoxytrityl-N²-isobutyl-desoxyguanosin hergestellt.

Beispiel IV

- 25 5'-Dimethoxytrityl-N⁶-benzoyl-desoxycytidin-3'-chlormethoxy-phosphit

Analog Beispiel II wurde eine Lösung dieses Nucleosidphosphoro-chloridits in 10,0 ml Pyridin aus 633,7 mg (1,0 mMol) 5'-Dimethoxy-trityl-N⁴-benzoyl-desoxycytidin hergestellt.

Beispiel V

5'-Dimethoxytrityl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-3'-chlormethoxy-phosphit

5 Analog Beispiel II wurde eine Lösung dieses Nucleosidphosphoro-chloridits in 10,0 ml Pyridin aus 657,7 mg (1,0 mMol) 5'-Dimethoxytrityl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin hergestellt.

Beispiel VISynthese von d-TCCTTA

10 50 mg (= 5 µMol) des mit DMTrdA^{bz} beladenen polymeren Trägers (siehe Beispiel I) wurden in eine Glasfritte gefüllt. Entsprechend der folgenden Auflistung wurden dann verschiedene Lösungsmittel und Reagenzienlösungen hinzugefügt, der Träger darin kurz aufgeschüttelt, und die Lösung nach der
15 gewünschten Umsetzung wieder entfernt, indem sie mit Hilfe eines Argon-Gasstromes von oben durch die Fritte hindurchgepreßt wurde.

- a) Abspaltung der DMTr-Gruppe mit 3 ml einer Lösung aus 70 g Zinkbromid, 500 ml Nitromethan und 5 ml Wasser. Reaktionszeit: 10 Minuten.
- 20 b) 4 x Waschen mit je 3 ml einer Mischung aus n-Butanol-Lutidin-THF (4:1:5).
- c) 4 x Waschen mit je 4 ml absolutem Pyridin.
- d) Ankondensation des nächsten Nucleotid-Bausteines:
25 1 ml der Pyridin-Lösung von 5'-Dimethoxytrityl-desoxythymidin-3'-chlormethoxyphosphit (Beispiel B) (ca.

100 μMol) wurden unter Argon in die Fritte zu dem polymeren Träger gegeben und dieser in der Lösung aufgeschüttelt.

Reaktionszeit: 10 Minuten.

5 e) 3 x Waschen mit je 3 ml absolutem Pyridin.

f) Oxidation des Phosphorigsäure-triesters mit 100 mg Jod, gelöst in 3 ml eines Gemisches aus THF, Lutidin und Wasser (2:2:1).

Reaktionszeit: 7 Minuten.

10 g) 3 x Waschen mit je 4 ml THF.

h) Acetylierung der nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen mit einer Lösung aus 150 mg 4-Dimethylaminopyridin, 0,3 ml Collidin, 0,25 ml Acetanhydrid und 2,5 ml THF.

Reaktionszeit: 5 Minuten.

15 i) 4 x Waschen mit je 3 ml Nitromethan. Dieser Zyklus von a) bis i) wurde nun vier weitere Male wiederholt, wobei bei Schritt d) der für die Sequenz jeweils benötigte Nucleotid-Baustein eingesetzt wurde.

Ausbeute-Bestimmung:

20 Nach Ankondensieren des letzten Nucleotid-Bausteines wurde das Trägermaterial im Ölpumpenvakuum getrocknet, eine Probe von ca. 1 mg genau abgewogen und mit 10,0 ml einer 0,1 M Lösung von Toluolsulfonsäure in Acetonitril versetzt. Durch die dabei eintretende Abspaltung des Dimethoxytrityl-Kations

25 erhält man eine orange-rot gefärbte Lösung, deren Absorption bei 498 nm gemessen wurde. Nach der Formel

$$\text{Beladung}[\mu\text{Mol/g}] = (\text{Abs.}^{498}) \cdot (\text{Verdünnungsfaktor}) \cdot 14,3$$

Gewicht des Trägers [mg]

läßt sich die Beladung des Träger-Materials mit Dimethoxytrityl-Schutzgruppen berechnen. Man erhielt: 43 μ Mol/g. Dies entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von 85 % pro Kondensationsschritt.

5 Abspaltung der Methylreste von den Phosphorsäuretriester-Gruppen:

Das Trägermaterial wurde 45 Minuten lang in 4 ml einer Lösung von Thiophenol, Triethylamin und Dioxan (1:1:2) geschüttelt, anschließend mit Methanol, dann mit Ether gewaschen.

Abspaltung der Basen-Schutzgruppen und gleichzeitige Abspaltung der Hexanucleotid-Kette vom polymeren Träger: Das Trägermaterial wurde 14 Stunden lang mit 10 ml konz. Ammoniak auf 50°C erwärmt, die wäßrige Lösung dann abgesaugt und das Filtrat auf ca. 2 ml eingengt.

Reinigung des Produkts:

Das so erhaltene Rohprodukt, das am 5'-Ende noch eine Dimethoxytrityl-Schutzgruppe trug, wurde der Reversed-Phase HPLC unterworfen. Säule: μ -Bondapak C₁₈ Fa. Waters; Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 25 % Acetonitril; Fluß 2 ml/min.; Retentionszeit: 14 Minuten. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden auf ca. 1 ml eingengt, mit 10 ml 80 % Essigsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurde bei 50°C im Vakuum zur Trockne eingengt, der Rückstand in 25 ml Wasser gelöst und das abgespaltene Dimethoxytritanol mit 3 x 15 ml Ether extrahiert. Die wäßrige Phase wurde erneut bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 2,5 ml Wasser gelöst, über Biogel P 2 (Säule: 60 x 1,7 cm) entsalzt und lyophilisiert.

Analyse des Produkts:

Als Reinheitskontrolle diene das analytische HPLC-Diagramm (Säule: 300 x 3,9 mm, μ -Bondapak C₁₈, Fa. Waters; Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 12 % Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min.; Retentionszeit: 3,7 Minuten).

5 Beispiel VII**Synthese von d-TAAGGAGGTTTA**

Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 300 mg (30 μ Mol) DMTrdA^{bz}~(P) .

HPLC-Diagramm des Produkts:

- 10 Säule: 300 x 3,9 mm, μ -Bondapak C₁₈, Fa. Waters;
Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 12 %
Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min; Retentionszeit:
4,4 Minuten

Beispiel VIII**15 Synthese von d-AGCTTAAACC**


Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 200 mg (16 μ Mol).

DMTrdC^{bz}~(P)

HPLC-Diagramm des Produkts:

- 20 Säule: 300 x 3,9 mm, μ -Bondapak C₁₈, Fa. Waters;
Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 12 %
Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min; Retentionszeit:
3,4 Minuten.

Beispiel IXSynthese von d-CATCTTTA


Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 150 mg
(1,32 μ Mol) DMTrdA^{bz} .

5 HPLC-Diagramm des Produkts:

Säule: 300 x 7,8 mm, μ -Bondapak C₁₈, Fa. Waters;

Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 20 %
Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min; Retentionszeit:
7,7 Minuten.

10 Beispiel XSynthese von d-AGCTTAAAGATG


Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 200 mg
(16,2 μ Mol) DMTrdG^{ibu} .

HPLC-Diagramm des Produkts:

15 Säule: 300 x 7,8 mm, μ -Bondapak C₁₈, Fa. Waters;

Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 26 %
Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min; Retentionszeit:
5,2 Minuten.

Beispiel XI20 Synthese von d-TGTGATCTGCCTCA


Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 250 mg (22 μ Mol)
DMTrdA^{bz} .

HPLC-Diagramm des Produkts:

Säule: 300 x 7,8 mm; μ -Bondapak C₁₈; Fa. Waters;

25 Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 25 %
Acetonitril; Fluß: 1,5 ml/min; Retentionszeit:
6,1 Minuten.

Beispiel XIISynthese von d-CAGATCACA

Hergestellt analog Beispiel VI ausgehend von 150 mg
(13,2 μmol) DMTrdA^{bz} .

5 HPLC-Diagramm des Produkts:

Säule: 300 x 7,8 mm; u-Bondapak C₁₈; Fa. Waters;

Eluans: 0,1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7 mit 20 %
Acetonitril; Fluß: 0,2 ml/min; Retentionszeit:
5,2 Minuten.

10 Analyse der Oligodeoxynucleotide

Die Sequenzanalyse der synthetisch hergestellten Oligodeoxy-
nucleotide wurde durchgeführt, nachdem diese in das Interfe-
ronproduktionsplasmid pER 33 eingebaut worden waren (siehe
Beispiel 2: Sequenzanalyse des Interferonplasmids pER 33).

15 Mit dieser Analyse wird gleichzeitig die Richtigkeit der
Basenabfolge in den Oligodeoxynucleotiden belegt (siehe
Fig. 5).

Beispiel 1Konstruktion des Expressionsplasmides pER 103

20 Die Konstruktion des Expressionsplasmides pER 103 ist
schematisch in Fig. 1 dargestellt.

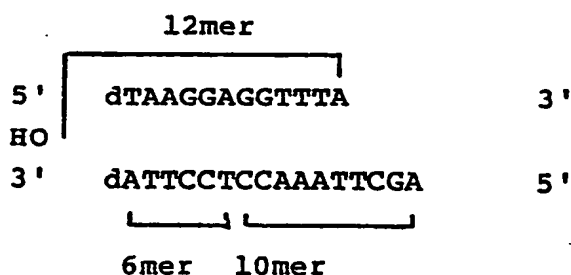
a) Isolierung des Promotor/Operator-Fragmentes

25 Das Plasmid pBR 101, das etwa 1000 bp des Tryptophan-
Operons von *Serratia marcescens* enthält, stellte das
Ausgangsmaterial für die Isolierung der Promotor/Opera-
tor-Region dar. Diese regulatorische Region liegt inner-
halb eines 90 bp langen Eco RI - Hae III-Fragmentes, in
dem der Promotor in der Richtung Eco RI \longrightarrow Hae III
orientiert ist.

Etwa 25 µg des Plasmides pBP 101 wurden mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaut, die zwei entstehenden Fragmente wurden durch Gelelektrophorese (1,4 % Agarose) voneinander getrennt und das 200 bp lange Fragment wurde elektrophoretisch aus dem Gel eluiert. Dieses Fragment wurde dann mit Hae III verdaut, die beiden Verdauungsprodukte wurden auf einem 6 % Polyacrylamidgel getrennt und das 90 bp lange Fragment (Promotor/Operator) wurde wieder aus dem Gel isoliert.

10. b) Konstruktion der Ribosomenbindungssequenz (RBS)

Die RBS wurde aus 3 synthetischen Oligonukleotiden zusammengesetzt: dem 6mer 5'-TCCTTA, dem 10mer 5'-AGCTTAAACC und dem 12mer 5'-TAAGGAGGTTTA. 500 pMole vom 6mer wurden mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase phosphoryliert und dabei radioaktiv markiert (siehe Teil A). Das Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten lang auf 70°C erhitzt, um die Kinase zu inaktivieren, hierauf wurden äquimolare Mengen von (nicht phosphoryliertem) 10mer und 12mer zugesetzt, das Oligonukleotidgemisch wurde auf 95°C erhitzt und dann langsam (über etwa 3 Stunden) auf 30-35°C abgekühlt, wobei die Oligonukleotide miteinander hybridisierten:



Durch Zusatz von 0,25 mM ATP und 5mM DTT wurden 6mer und 10mer mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden (siehe Teil A). Das Fehlen von Phosphatresten an den 5'-Enden des 12mers und des 10mers verhinderte das Ent-

stehen von multimeren Ligationsprodukten. Nach der Reaktion wurde 10 Minuten auf 70°C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren, hierauf wurden nach Zugabe von 0,5 mM ATP und 5 mM DTT in einer weiteren Kinasereaktion (siehe Teil A) auch die 5'-Enden des 12mers und des 10mers kinasiert, wodurch die RBS fertiggestellt war.

c) Verknüpfung von Promotor und RBS

12 pMole des 90 bp langen Eco RI-Hae III Promotor-/Operator-Fragmentes wurden unter Standardbedingungen (siehe Teil A) mit 60 pMolen RBS ligiert. Da nur das durch den Hae III-Schnitt erzeugte stumpfe Ende ("blunt end") des 90 bp-Fragmentes mit dem stumpfen Ende der RBS ligieren kann, entstanden nur Moleküle, die die RBS in der richtigen Orientierung stromabwärts vom Promotor enthielten. Nach der Reaktion wurde die Ligase 10 Minuten bei 70°C inaktiviert, es wurde auf TA-Puffer-Konzentration (siehe Teil A) eingestellt und mit 200 Einheiten Hin dIII und 10 Einheiten Eco RI nachverdaut. Dieses war vorteilhaft, um die in der Ligasereaktion entstandenen Multimeren (da neben der gewünschten Reaktion sowohl Eco RI-Enden, als auch Hin dIII-Enden miteinander ligieren konnten) wieder in Monomere zu verwandeln. Hierauf wurde die Probe auf einem 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und das etwa 100 bp lange Promotor-/Operator-RBS-Fragment (das ein Eco RI- und ein Hin dIII-Ende besitzt) aus dem Gel herausgeschnitten und elektrophoretisch eluiert, um es vom Überschuß der nicht ligierten RBS abzutrennen. Hiermit war der für die Expression verantwortliche Teil des Expressionsplasmides fertiggestellt (siehe Fig. 3).

Die in Fig. 3 dargestellte Nukleotidsequenz läßt sich durch literaturbekannte Methoden der Polynukleotidsynthese nachvollziehen.

d) Insertion des Promotor/Operator-RBS-Fragments in das Plasmid pBR 322

Etwa 2 µg des Plasmides pBR 322 wurden mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hin dIII geschnitten, wobei zwei Fragmente entstanden: ein großes mit 4332 bp und ein kleines mit 29 bp. Das große Fragment wurde durch Elektrophorese auf einem 0,8 % Agarosegel vom kleinen Fragment getrennt, aus dem Gel herausgeschnitten und eluiert. Etwa 0,4 pMole dieses Fragments wurden dann mit etwa 10 pMolen des Promotor/Operator-RBS-Fragmentes ligiert (siehe Teil A). Das pBR 322-Fragment konnte wegen seiner zwei nicht zusammenpassenden überhängenden Enden nicht mit sich selbst ligieren; da das Promotor-/Operator-RBS-Fragment nur in einer Orientierung in das Plasmid ligiert werden konnte, erfolgte Promotion in Richtung Hin dIII-Spaltstelle, zum Tetracyclinresistenz-Gen von pBR 322.

e) Transformation von Escherichia coli mit dem Expressionsplasmid pER 103

Escherichia coli HB 101 wurde mit dem Reaktionsgemisch dieser letzten Ligierung auf literaturbekannte Weise transformiert (siehe Dworkin und Dawid, Dev. Biol. 76, 435-448 (1980)) und die Transformanten wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektioniert. Hierfür wurden E. coli HB 101 Zellen zu einer Dichte von ca. 2×10^8 Zellen/ml aufgezüchtet. Die Zellen wurden pelletiert und in 100 mM CaCl_2 -Lösung suspendiert (20 Minuten bei 0°C). Danach wurden die Zellen mit dem Reaktionsgemisch der Ligasereaktion 5 Minuten bei 0°C - 4°C und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 - 1 ml 1-Broth wurde 15 - 30 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. 19 Transformanten wurden ausgewählt und mit Hilfe von Hae III-Restriktionsverdauungen auf ihren möglichen Gehalt des Promotor/Operator-RBS-Fragmentes geprüft. Das 192 bp lange pBR 322/Hae III-Fragment

5 fehlte und war durch ein 264 bp-Fragment ersetzt worden (16 bp von der Hae III-Spaltstelle in pBR 322 "links" von der Eco RI-Spaltstelle + 103 bp Promotor/Operator-RBS-Fragment + 145 bp von der Hin dIII-Spaltstelle bis zur nächsten Hae III-Spaltstelle "rechts" davon, in pBR 322). Von den 19 ausgewählten Transformanten zeigten 18 das erwartete Verdauungsmuster (siehe Fig. 2).

f) Sequenzanalyse der Promotor/Operator-RBS-Region des Expressionsplasmides pER 103

10 Um die Richtigkeit der konstruierten Expressionsplasmide ohne Zweifel festzustellen, wurde eines dieser Plasmide (pER 103) in der Promotor/Operator-RBS-Region sequenziert und deren Position in pBR 322 festgestellt. Die Sequenzanalyse wurde nach der literaturbekannten Methode von Maxam und Gilbert (siehe Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 15 560-564 (1977)) durchgeführt und erfolgte von der Eco RI-Spaltstelle in Richtung Hin dIII-Spaltstelle (und darüber hinaus), wie auch von der Hin dIII-Spaltstelle in Richtung Eco RI-Spaltstelle (und darüber hinaus). Es 20 ergab sich die Nukleotid-Sequenz, welche in Fig. 3 dargestellt ist.

25 pER 103 ist somit ein Expressionsplasmid, das die Promotor/Operator-Region des Tryptophanoperons von *Serratia marcescens* in Kombination mit einer synthetischen RBS enthält. Dieses neue Expressionsplasmid promoviert die Transkription von Genen, die in seine Hin dIII-Spaltstelle eingebaut werden, und ermöglicht eine effiziente Translation dieser Transkriptionsprodukte. Daß dieses der Fall ist, wird in Beispiel 2 gezeigt.

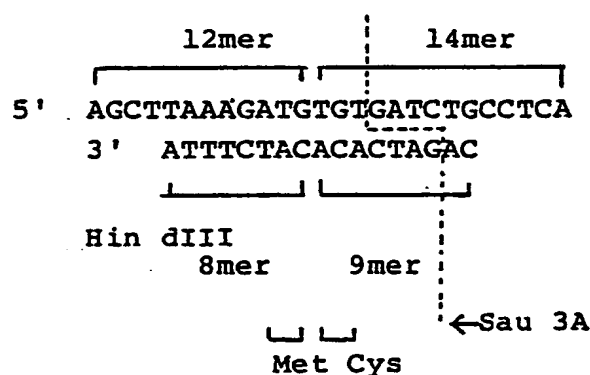
Beispiel 2Konstruktion des Interferonproduktionsplasmides pER 33a. Konstruktion des für reifes Interferon codierenden Gens, mit Ausnahme des Codons für das NH²-terminale Cystein

5 Etwa 1 µg des Pst I-Insertes von 1 F7 wurde mit dem Restriktionsenzym Sau 3A verdaut, und das 177 bp lange Fragment, das von der Sau 3A-Spaltstelle nach dem NH₂-terminalen Cysteincodon bis zur nächsten Sau 3A-Spaltstelle reicht und eine Ava II-Spaltstelle beinhaltet, wurde von einem 6 % Polyacrylamidgel isoliert. Es wurde mit 1 Einheit alkalischer Phosphatase behandelt (siehe Teil A) und nach Entfernung der Phosphatase durch Phenol- und Ätherextraktion mit Äthanol gefällt. Das Fragment wurde anschließend mit Ava II geschnitten, 10 wodurch das gewünschte 34 bp Sau 3A-Ava II-Fragment und ein 143 bp-Fragment erhalten wurden.

15 Parallel dazu wurde das interferonspezifische 646 bp Ava II-Fragment, das von der Ava II-Spaltstelle innerhalb des 177 bp Sau 3A-Fragmentes bis hinter das Terminationscodon reicht, aus dem Plasmid 1 F7 präpariert. Etwa 20 0,5 µg dieses 646 bp Ava II-Fragmentes wurden nun zusammen mit der Mischung aus 34 bp und 143 bp Sau 3A-Ava II-Fragmenten mit dem Enzym DNA-Ligase inkubiert (Ligierung von kohäsiven Enden, siehe Teil A). Dadurch 25 entstanden Ava II-Fragmente, die, kovalent verbunden, von Ava II-Sau 3A-Fragmenten flankiert sind. Sobald ein Ava II-Sau 3A-Fragment mit einem Ava II-Fragment ligiert hat, können an dieser Stelle keine weiteren Ligierungen mehr stattfinden, da die Sau 3A-Enden dephosphoryliert 30 worden waren. Nach der Ligasereaktion wurde 10 Minuten auf 70°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren, dann wurden 5 mM DTT und 0,25 mM ATP zugegeben, und die dephosphorylierten Sau 3A-Enden wurden wieder kinasiert

(siehe Teil A). Das Reaktionsgemisch wurde auf einem 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und Moleküle im Bereich von 700-800 bp (ein 646 bp Ava II-Fragment flankiert von zwei Ava II-Sau 3A-Fragmenten) und im Bereich von 1300 - 1500 bp (zwei miteinander ligiert 646 bp Ava II-Fragmente flankiert von Ava II-Sau 3A-Fragmenten) wurden eluiert.

b. Präparation des Oligonukleotid-Komplexes der Formel



4 synthetische hergestellte Oligonukleotide, nämlich ein 14mer 5' TGTGATCTGCCTCA, ein 12mer 5' AGCTTAAAGATG, ein 9mer 5' CAGATCACA und ein 8mer 5' CATCTTTA, wurden folgendermaßen umgesetzt: je 250 pMole 8mer, 9mer und 14mer wurden phosphoryliert (siehe Teil A), nach der Reaktion wurde die Kinase durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert, es wurden 250 pMole nicht kinasiertes 12mer zugegeben und das Oligonukleotidgemisch langsam (über etwa 3 Stunden) auf 35°C abgekühlt, um Hybridisierung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Hierauf wurden nach Zugabe von 5 mM DTT und 0,25 mM ATP die Oligonukleotide miteinander ligiert ("blunt-end"-Ligierung, siehe Teil A). Das Fehlen eines Phosphatrestes am 5'-Ende des 12mers verhinderte die Bildung von Dimeren; das überhängende Ende des 14mers ist nicht selbstkomplementär, es kann nicht zur Dimerisierung führen.

Ein Aliquot (25 pMole) des ligierten Oligonukleotidkomplexes wurde mit 80 Einheiten Sau 3A verdaut, um das ins Interferongen passende Sau 3A-Ende zu erzeugen. Hierauf wurde die Probe 10 Minuten auf 75°C erhitzt, mit Phenol extrahiert und mit Äthanol gefällt. Hiermit war das Linkerfragment, das das Interferongen mit dem Hin dIII-geschnittenen pER 103 erfindungsgemäß verbindet, fertiggestellt.

c. Verknüpfung von Interferongen und Oligonukleotid-Komplex, Ligierung in pER 103

Die isolierten Interferonfragmente (siehe Beispiel 2a), die etwa 1 pMol von Molekülen darstellen, wurden mit dem Sau 3A-geschnittenen Oligonukleotidkomplex (etwa 25 pMole) durch Ligierung der kohäsiven Sau 3A Enden (siehe Teil A) verbunden. Wieder verhinderte das Fehlen eines Phosphatrestes am Hin dIII-Ende des Oligonukleotidkomplexes (12mer) den Aufbau von Multimeren. Es entstanden Interferongen-Moleküle, die auf beiden Seiten von einem Oligonukleotidkomplex mit einem freien Hin dIII-Ende flankiert waren. Nach Hitzedenaturierung der Ligase und Zugabe von 5 mM DTT und 0,25 mM ATP wurden diese Enden phosphoryliert (siehe Teil A), dann wurde eine Isopropanolfällung (siehe Teil A) durchgeführt, um die ebenfalls in der Ligasereaktion entstandenen Oligonukleotidkomplex-Dimeren abzutrennen. Hierauf wurde die Konstruktion mit 0,05 µg Hin dIII-geschnittenem, phosphatasebehandeltem pER 103 ligiert (Ligierung von kohäsiven Enden, siehe Teil A). Die Phosphatasebehandlung (siehe Teil A) des Hin dIII-geschnittenen Plasmids verminderte dessen Rezirkularisierung in der Ligasereaktion. Hiermit war ein Gemisch von Plasmiden fertiggestellt, das zu 50 % Interferonproduktionsplasmide enthielt (nämlich diejenigen Plasmide, die ein 34 pb Sau 3A-Ava II-Fragment in der Ligierung mit dem 646 bp Ava II-Fragment am Genbeginn erhalten hatten - siehe Beispiel 2a).

d. Transformation von Escherichia coli HB 101 und Analyse der Transformation im Hinblick auf Interferonproduktion

Das gemäß Beispiel 2c hergestellte Plasmidgemisch wurde analog Beispiel 1e zur Transformation von Escherichia coli HB 101 verwendet (siehe Dworkin und Dawid, Dev. Biol. 76, 435-448 (1980)). Etwa 20 % der erhaltenen Transformanten hatten Inserte (der Rest waren rezirkularisierte pER 103-Plasmide), von denen mehrere auf Interferonexpression untersucht wurden. Dazu wurden 100 ml Bakterienkultur in M9 Minimum Medium, dem alle Aminosäuren außer Tryptophan (20 µg/ml pro Aminosäure), sowie Thiamin (1 µg/ml), Glucose (0,2 %) und der Induktor des Tryptophanoperons Indol-(3)-acrylsäure (IAA, 20 µg/ml; siehe Hallewell und Emtage in Gene 9, 27-47 (1980)), zugesetzt worden waren, zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 gezüchtet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation 10 Minuten bei 7000 U/min pelletiert, 1 x in 50 mM TrisHCl, pH 8, 30 mM NaCl gewaschen und schließlich in 1,5 ml desselben Puffers suspendiert. Nach Inkubation mit 1 mg/ml Lysozym 30 Minuten lang auf Eis wurden die Bakterien 5 x gefroren und getaut und hierauf die Zellbruchstücke durch Zentrifugation eine Stunde bei 40 000 U/min entfernt. Der Überstand wurde steril filtriert und im Plaquereduktionstest mit V3-Zellen und Vesicular Stomatitis Virus auf Interferonaktivität getestet. Etwa die Hälfte aller Klone (mit Insert) zeigte beträchtliche Interferonexpression: 2×10^8 Einheiten (internationale Referenzeinheiten) pro Liter Kultur.

e. Sequenzanalyse des Interferonproduktionsplasmids pER 33

Einer dieser interferonproduzierenden Klone (pER 33) wurde ausgewählt und von der Promotor/Operator-Region weg bis ins Interferongen hinein sequenziert, um die Richtigkeit des konstruierten Plasmides festzustellen.

Die Sequenzanalyse wurde wieder nach Maxam und Gilbert (siehe Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)) durchgeführt und erfolgte von der am 3'-Ende radioaktiv markierten Eco RI-Spaltstelle ausgehend in Richtung Interferongen. Es ergab sich die erwartete Sequenz, ein Ausschnitt davon ist in Fig. 5 dargestellt. In diesem Ausschnitt sind alle zur Konstruktion von pER 33 verwendeten Oligonukleotidfragmente zu sehen.

Die vorstehend erwähnten Eigenschaften belegen, daß das erfindungsgemäß hergestellte Expressionsplasmid pER 103 die Promotor/Operator-Sequenz des Tryptophanoperons von *Serratia marcescens* in Kombination mit einer synthetischen Ribosomenbindungssequenz enthält. Am Beispiel von Leukocyteninterferon konnte gezeigt werden, daß in das Expressionsplasmid pER 103 in geeigneter Weise eingebaute Gene hohe Werte an Expression zeigen. Das Expressionsplasmid pER 103 wurde in *Escherichia coli* K 12, HB 101 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen Grisebachstraße 8, D 3400 Göttingen, unter der DSM-Nr. 2773 am 27. Oktober 1983 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiel 3

Konstruktion des Interferonplasמידs pER 21/1

Die Konstruktion des Plasמידs pER 21/1 ist schematisch in Figur 6 dargestellt.

a) Präparation des IFN α A Gens aus pER 33

2 μ g pER 33 wurden mit den Restriktionsenzym EcoRI und BamHI geschnitten, wodurch zwei Fragmente der Längen ca. 1300 bp und ca. 4000 bp entstanden. Diese Fragmente wur-

den auf einem 1,2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das kürzere Fragment wurde durch Elektroelution aus dem Gel isoliert. Die Enden dieser DNA wurden durch Zugabe von je 1,25 nMol dATP, dGTP, dCTP und dTTP sowie von 2 Einheiten Klenowfragment der DNA-Polymerase I in stumpfe Enden überführt. Die DNA wurde durch Phenolextraktion und Präzipitation aus äthanolischer Lösung gereinigt und anschließend in 15 µl H₂O aufgenommen.

Etwa 15 pMol EcoRI-Linker (New England Biolabs Inc.) wurden durch Zugabe von γ-³²P-ATP und T4-Polynukleotidkinase in 5 µl Reaktionslösung an den 5'Enden phosphoryliert. Nach Hitzeinaktivierung der Kinase wurde die DNA, 5 nMol ATP und 0,1 Einheiten T4-Ligase zugesetzt und 16 Stunden bei 14°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Isopropanolfällung von niedermolekularen Substanzen gereinigt.

Die DNA wurde abschließend mit 20 Einheiten Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, nochmals durch Isopropanolfällung gereinigt und in 10 µl H₂O gelöst.

b) Linearisierung des Plasmids pER 33

Ca. 2 µg pER 33 wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt. Anschließend wurde alkalische Phosphatase zugesetzt, um die 5'Phosphatreste zu entfernen. Die ca. 5300 bp lange, lineare DNA wurde durch Elektrophorese in einem 1,2 % Agarosegel und Elektroelution von restlichem, nicht geschnittenem pER 33 gereinigt. Die DNA wurde mit Phenol und Äther extrahiert, aus äthanolischer Lösung gefällt und in 10 µl H₂O gelöst.

c) Verknüpfung des linearisierten pER 33 mit dem zusätzlichen Gen für IFN α A

4 μ l des mit EcoRI-Linkern versehenen DNA-Stückes, das das IFN α A Gen plus regulatorische Elemente enthält, wurden mit 0,5 μ l EcoRI-linearisiertem und dephosphoryliertem pER33 in 20 μ l Reaktionslösung mit Hilfe von 0,1 Einheiten T4-Ligase miteinander ligiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 14°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 68°C zerstört.

d) Transformation von E.coli HB101 und Analyse der Transformation im Hinblick auf Interferonproduktion

E.coli HB101 wurde analog Beispiel 1e mit der DNA aus Beispiel 3c transformiert. Zwei der so hergestellten Klone wurden analog Beispiel 2d auf Interferonexpression mittels Plaquereduktionstests geprüft. Während der Klon pER 33 bis zu 200×10^6 Einheiten IFN pro 1 l Kultur aufwies, ergaben sich mit einem der neuen Klone, pER 21/1 bezeichnet, überraschenderweise mehr als 300×10^6 Einheiten pro Liter Kultur.

e) Restriktionsenzymanalyse des pER 21/1

Das Plasmid pER 21/1 wurde in größerer Menge isoliert und mittels Restriktionsenzymverdauung mit Hin dIII analysiert. Da die in pER33 in die EcoRI Stelle eingebrachte DNA zwei identische EcoRI-Enden aufwies, waren zwei Orientierungen dieser DNA im pER 21/1 möglich. Restriktionsenzymverdauung mit Hin dIII von pER 21/1 mit parallel gerichteten Interferongenen sollte Fragmente der ungefähren Größe von 4100, 950 (2 Fragmente) und 450 bp zeigen. Wären die beiden Gene jedoch entgegengesetzt orientiert, sind Fragmente der ungefähren Größe von 4350, 950 (2 Fragmente) und 200 bp zu erwarten. Der Verdauung von ca. 2 μ g pER 21/1 mit dem Restriktionsenzym Hin dIII und anschließende Elektrophorese in einem 1,4 % Agarose-

gel ergab Fragmente der ungefähren Größe 4100, 950 und 450 bp. Daher sind die beiden IFN α A Gene parallel zueinander orientiert (siehe Figur 6).

Beispiel 4

5 Konstruktion des Interferonproduktionsplasmides parpER 33

Die Konstruktion des Plasmides parpER 33 ist schematisch in Fig. 7 dargestellt.

a) Präparation des par-Lokus

10 Etwa 200 pMol EcoRI Linker (New England Biolabs Inc.) wurden in 20 μ l Reaktionslösung mit 9 Einheiten T4-Poly-nukleotidkinase und 10 nMol ATP an den Enden phosphoryliert, und das Enzym anschließend hitzeinaktiviert.

15 8 μ g des Plasmids pPM 31 wurden mit dem Restriktionsenzym AvaI geschnitten. Die Enden des linearisierten Plasmids wurden durch Zugabe von je 5 nMol dATP, dGTP, dTTP sowie 4 Einheiten des Enzyms Klenowfragment der Polymerase I in stumpfe Enden überführt. Die DNA wurde durch Phenolextraktion und Präzipitation aus äthanolischer Lösung gereinigt und in 40 μ l H₂O aufgenommen.

20 Die EcoRI Linker wurden zusammen mit der linearisierten und stumpfe Enden aufweisenden DNA in 70 μ l Reaktionslösung mit 6 nMol ATP und 1 Einheit T4-Ligase 16 Stunden bei 14°C behandelt. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Lösung auf 50 mM NaCl und 50 mM Tris-Cl pH=7,6
25 eingestellt und die DNA mit 300 Einheiten EcoRI behandelt. Nach 2 Stunden Inkubation wurde das Restriktionsenzym hitzedenaturiert und die DNA elektrophoretisch in einem 1,4 % Agarosegel aufgetrennt. Das den par-Lokus
30 beinhaltende Stück DNA von ca. 400 bp Länge wurde aus dem Gel elektroeluiert, durch Phenolextraktion und Fällung

aus äthanolischer Lösung gereinigt und in 50 µl H₂O gelöst. Dieses Stück DNA weist nun an seinen Enden EcoRI spezifische Überhänge auf.

b) Linearisierung des Plasmids pER 33

5 Etwa 2 µg pER 33 wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt. Anschließend wurden alkalische Phosphatase
10 zugesetzt, um die 5'Phosphatreste zu entfernen. Die ca. 5300 bp lange, lineare DNS wurde durch Elektrophorese in einem 1,2 % Agarosegel und Elektroelution von restlichem, nicht geschnittenem pER 33 gereinigt. Die DNA-Lösung wurde mit Phenol und Äther extrahiert, aus äthanolischer Lösung gefällt und in 50 µl H₂O gelöst.

c) Verknüpfung des linearisierten pER 33 mit der par-Lokus DNA

15 1 µl linearisierte pER 33 DNA wurde mit 1 µl par-Lokus DNA in 20 µl Reaktionslösung mit Hilfe von 0,1 Einheiten T4-Ligase miteinander ligiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 14°C wurde das Enzym hitzeinaktiviert.

20 d) Transformation von E.coli HB101 und Analyse der Plasmide aus den transformierten Bakterien

25 E.coli HB101 wurde analog zu Beispiel 1e mit der DNA aus Beispiel 4c transformiert. Es wurden ca. 50 Kolonien erhalten. Aus zehn dieser Kolonien wurde eine geringe Menge Plasmid DNA isoliert (Birnboim und Doly, Nucleic Acid Research 7, 1513-1523 (1979)) und mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten. Die Analyse durch Agarosegelelektrophorese ergab, daß alle diese Plasmide den ca. 400 bp langen par-Lokus enthielten. Eines dieser Plasmide wurde ausgewählt und mit parpER 33 bezeichnet.

e) Analyse des parpER 33 im Hinblick auf Interferonproduktion und Stabilität

5. Analog Beispiel 2d wurden Bakterien, die entweder pER 33 oder parpER 33 enthielten, angezüchtet und anschließend im Plaquereduktionstest auf Interferongehalt geprüft. Beide Stämme zeigten etwa dasselbe Niveau der Interferon-expression.

10 In einem Langzeitversuch, der sich über 120 Bakterien-generationen erstreckte, wurde die Stabilität der Plasmide pER 33 und parpER 33 in E.coli HB101 in Abwesenheit des Selektionsdruckes durch das Antibiotikum Ampicillin untersucht. In regelmäßigen Abständen wurden der Kultur Proben entnommen, und die Bakterien auf Interferongehalt geprüft. Es stellte sich heraus, daß die pER 33 enthal-
15 tenden Bakterien nach ca. 60 Generationen die Interferonproduktion einstellten. Bakterien, die parpER 33 enthielten, produzierten jedoch auch noch nach 120 Generationen unvermindert Interferon α A.

20 Damit wurde gezeigt, daß das Einbringen des par-Lokus in pER 33 ("parpER 33") die Stabilität des Plasmids in E.coli HB101 erhöht.

Verwendete Begriffe und Abkürzungen

	ATP	Adenosintriphosphat
	Basenpaar:	2 komplementäre Nukleotide, z.B. A-T, G-C
5	blunt end:	vollständig basengepaartes Ende eines DNA-Doppelstrangmoleküls, zum Unterschied von überhängen- den Einzelstrang-Enden
	bp:	Basenpaare
10	BSA:	Bovinseryumalbumin
	cDNA:	eine zu mRNA komplementäre DNA
	codieren:	die Information für etwas tra- gen; DNA trägt in der Nukleotid- sequenz die Information für die Aminosäuresequenz eines Proteins
15	Codon:	Gruppe von 3 Nukleotiden, die für eine bestimmte Aminosäure oder aber für den Abbruch der Polypeptidsynthese codiert
20	dephosphorylieren:	eine Phosphatgruppe entfernen
	DNA:	Deoxyribonukleinsäure
	DTT:	Dithiothreitol
	Elektrophorese:	Trennung von (DNA-) Molekülen im elektrischen Feld
25	Expression:	Umsetzung der Information eines Gens in mRNA durch Transkrip- tion und in weiterer Folge in Polypeptid durch Translation
	Expressionsplasmid:	Plasmid, das die Expression von darin insertierten Genen ermöglicht
30	Gen:	Abschnitt auf der DNA, der die Information für ein bestimmtes

- 36 -

	Genprodukt:	Transkript (RNA-Molekül) trägt, das in weiterer Folge in ein Protein übersetzt werden kann
5	Hybridisierung (von Nukleinsäuren):	RNA (Transkript), Protein (Translationsprodukt)
		Ausbildung von stabilen Komplexen zwischen zueinander komplementären DNA-Strängen
10	Hybridplasmid:	Plasmid, das einen DNA-Abschnitt fremden Ursprungs enthält
	IFN- α A:	Leukocyteninterferon Subtyp A
	Initiationscodon:	das Codon ATG, das für Methionin codiert und den Start der Translation signalisieren kann
15		
	Insert:	das Stück fremder DNA, das sich in einem Hybridplasmid befindet
20	Kinase:	Enzym, das 5' OH-Gruppen an DNA- und RNA-Molekülen phosphorylieren kann
	kinasieren:	mit 5'-Phosphatgruppen versehen
	Klon:	Bakterienkolonie, von einem einzelnen Bakterium abstammend
25	kohäsive Enden:	überhängende Einzelstrangenden eines DNA-Moleküls, die miteinander hybridisieren können
30	komplementär:	zueinander passend (Nukleotide in der DNA: A ist komplementär zu T, G ist komplementär zu C)
	Ligase:	Enzym, das verschiedene DNA-Moleküle kovalent miteinander verbinden kann
35	ligieren:	kovalent miteinander verbinden (DNA-Moleküle)

- 37 -

	mRNA:	messenger RNA, ist eine für ein Polypeptid codierende RNA
	Nukleotid:	Baustein einer DNA oder RNA (A = Adenosin, C = Cytidin, G = Guanosin, T = Thymidin, U = Uracil)
5	Nukleotidsequenz:	Abfolge der Nukleotide in einem DNA- oder RNA-Molekül
	Oligonukleotid:	wenige miteinander durch Phosphodiesterbindungen verknüpfte Nukleotide (kurzer einzelsträngiger DNA-Abschnitt)
10	Operator:	Teil der regulatorischen Region eines Operons, an den der Repressor bindet, wodurch Transkription verhindert wird
15	Operon:	Gruppe von (bakteriellen) Genen, die von einer Operator-Region aus reguliert werden
20	Phosphatase:	Enzym, das 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen entfernen kann
	Plasmid:	ein extrachromosomales, zirkuläres DNA-Molekül
25	Promotor:	DNA-Sequenz, die zur Bindung des Enzyms RNA-Polymerase befähigt ist
	RBS:	siehe Ribosomenbindungssequenz
	Restriktionsendonuklease (Restriktionsenzym):	Enzym, das bei einer bestimmten symmetrischen DNA-Sequenz den DNA-Doppelstrang spalten kann
30	Restriktionsfragmente:	Bruchstücke einer DNA, die durch Verdauung mit einer Restriktionsendonuklease entstehen
35	Ribosomenbindungssequenz:	Teil der mRNA, der ans Ribosom binden kann

- 38 -

RNA:	Ribonukleinsäure
RNA-Polymerase:	Enzym, das einen zu DNA komplementären RNA-Strang synthetisieren kann
5. Sequenz:	siehe Nukleotidsequenz
Terminationscodon:	Codon, das das Ende der Translation signalisiert
Transformant:	Bakterium, das fremde DNA (ein Plasmid) durch Transformation erhalten hat
10. Transformation:	Einschleusen fremder (Plasmid-) DNA in Bakterien
Transkription:	Synthese von RNA komplementär zu einer DNA-Matrize
15. Translation:	Umsetzung der Information von mRNA in ein Polypeptid
Tris:	Trishydroxymethylaminoethan

Kurze Beschreibung der IllustrationenFigur 1

5 zeigt eine schematische Darstellung der Konstruktion des Expressionsplasmides pER 103. Die Fragmentgrößen sind nicht maßstabgerecht dargestellt.

Figur 2

zeigt die Hae III-Verdauungsmuster der Plasmide pBR 322 und pER 103. Das 192 bp-Fragment von pBR 322 ist in pER 103 durch ein Fragment von ca. 270 bp ersetzt.

Figur 3

10 zeigt die Nukleotidsequenz von pER 103 zwischen der Eco RI und der Hin dIII-Spaltstelle. Der Rest des Plasmides entspricht dem großen Hin dIII-Eco RI-Fragment von pBR 322.

Figur 4

15 ist eine schematische Darstellung der Konstruktion des Interferonproduktionsplasmides pER 33. ↓ : Pst I-Spaltstelle, ¶ : Sau 3A-Spaltstelle, ↗ : Ava II-Spaltstelle. Mit Ausnahme der Restriktionskarte des 1 F7-Inserts sind die Fragmente nicht maßstabgerecht dargestellt.

Figur 5

25 zeigt einen Ausschnitt eines Sequenzgels, auf dem die Verbindung Promotor-RBS-Interferongen zu sehen ist. Alle in der Konstruktion von pER 33 verwendeten Oligonukleotidfragmente sind vorhanden. Zum besseren Verständnis ist dieselbe Sequenz darunter noch einmal doppelsträngig angegeben; die einzelnen Oligonukleotidbausteine sind eingezeichnet.

Figur 6

30 ist eine schematische Darstellung der Konstruktion des Interferonproduktionsplasmids pER 21/1. Die Fragmente bzw. Plasmide sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

- 40 -

Figur 7

ist eine schematische Darstellung der Konstruktion des Interferonproduktionsplasmids parpER 33. Die Fragmente und Plasmide sind nicht maßstabgetreu wiedergegeben.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz der Formel

5 'AATTCACGCTGATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
 3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAACACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

5

← Promotor →

GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTA
 CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCGA

← Promotor/Operator → * RBS → Hin dIII

- 10 2. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotid-
 sequenz gemäß Anspruch 1 zusätzlich anschließend an die
 Ribosomenbindungssequenz eine Linkersequenz enthält.

3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2 der Formel

15

5 'AATTCACGCTGATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
 3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAACACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

← Promotor →

GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAGCT
 CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCGA

20

← Promotor/Operator → * RBS → Hin dIII

TAAAGATG

ATTTCTAC

← Linker

4. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß eine Sequenz gemäß den Ansprüchen 2 oder 3 zusätzlich die Sequenz eines Strukturgens für ein beliebiges Polypeptid in derartiger Form enthält, daß dieses durch Bakterien zur Expression gebracht wird und die Kombination der DNA-Sequenzen derartig erfolgt, daß die DNA-Sequenz an die DNA-Linkersequenz durch 3',5' Phosphodiesterbindung gekoppelt ist.
5. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturgen für ein Interferon codiert.
6. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturgen für humanes Interferon α A codiert.
7. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß diese die Formel

15 5' AATTCACGCTGATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAAACAGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

← Promotor →

GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAAGC
CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTTCG

20 — Promotor/Operator — * RBS —

TTAAAGATGTGTGATCTGCCTCAAA.....

AATTCTACACACTAGACGGAGTTT.....

Hin dIII

← Linker * IFN- α A-Gen →

aufweist.

- 25 8. DNA-Ribosomenbindungs-/Linkersequenz der Formel

5'TAAGGAGGTTTAAAGCTTAAAGATG.....

3'ATTCCTCCAAATTCGAATTTCTAC.....

9. DNA-Linkersequenz der Formel

5' AGCTTAAAGATG

3' ATTCTAC

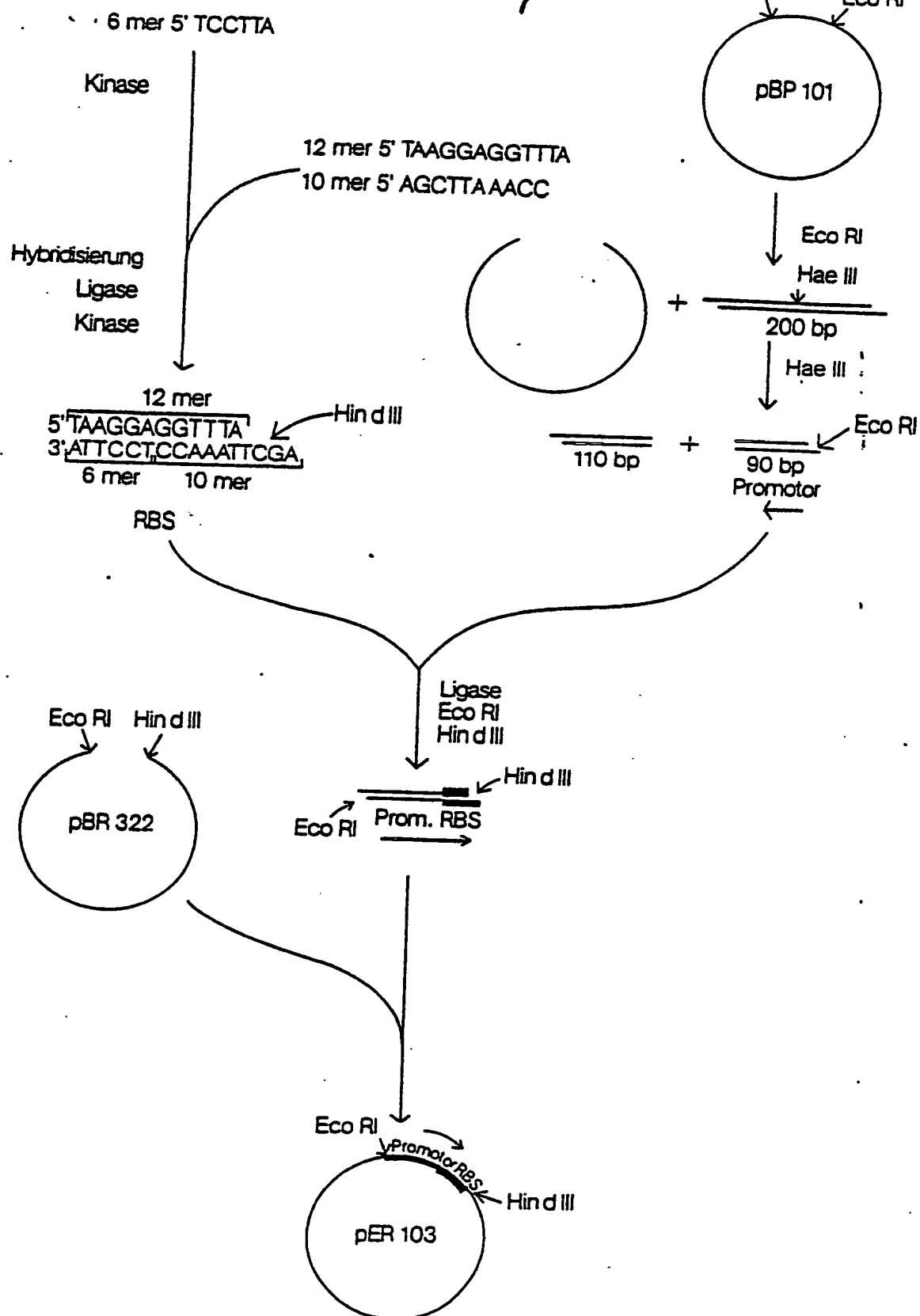
- 5 10. Plasmid, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 10 11. Expressionsplasmid gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß dieses eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 8 enthält, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
12. Expressionsplasmid pER 103, dadurch gekennzeichnet, daß dieses die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 enthält, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 15 13. Produktionsplasmide gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine oder mehrere DNA-Sequenzen gemäß den Ansprüchen 4, 5, 6 oder 7 und gegebenenfalls einen par-Lokus enthalten, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 20 14. Interferonproduktionsplasmide gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine oder zwei DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 7 und gegebenenfalls eine aus pPM 31 isolierten par-Lokus enthalten, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 25 15. Interferonproduktionsplasmid pER 33, dadurch gekennzeichnet, daß dieses die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 7 enthält, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.

16. Interferonproduktionsplasmid pER 21/1, dadurch gekennzeichnet, daß dieses zweimal die DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 7 enthält, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 5 17. Interferonproduktionsplasmid parpER 33, dadurch gekennzeichnet, daß dieses die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 7 und einen aus pPM 31 isolierten par-Lokus enthält, und dessen in an sich bekannter Weise erhältlichen Mutanten.
- 10 18. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine 90 bp Promotor/Operator-Sequenz des Tryptophanoperons von *Serratia marcescens* mit einer Ribosomenbindungssequenz der Formel
- 5' TAAGGAGGTTTA
3' ATTCCTCCAAATTCTGA
- 15 verbunden wird.
19. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 mit einer Linkersequenz gemäß den Ansprüchen 2 oder 3 verbunden wird.
- 20 20. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 mit einem für ein Polypeptid codierenden Strukturgen verbunden wird
- 25 21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Strukturgen für humanes Interferon αA codiert.

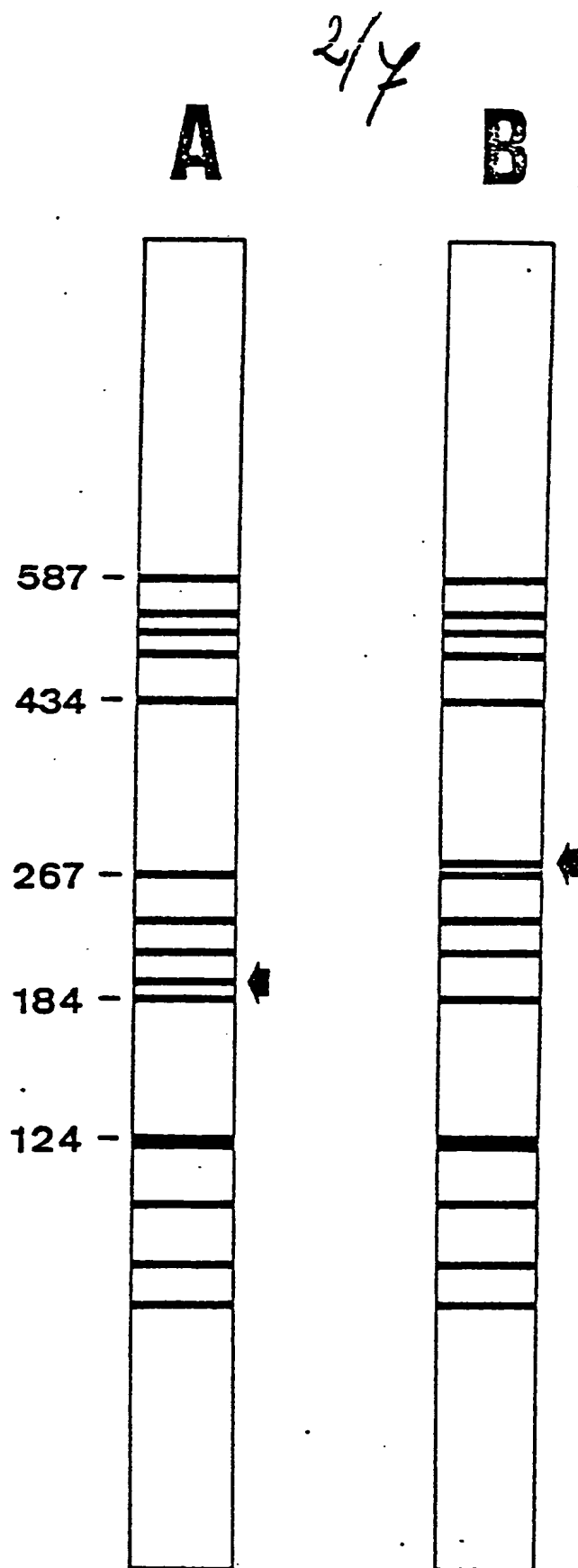
22. Verfahren zur Herstellung eines Plasmids gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Plasmid, vorzugsweise Plasmid pBR 322, mit einer DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 kombiniert.
- 5 23. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsplasmids gemäß Anspruch 11 oder 12 dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor das Plasmid pBR 322 ist, aus welchem durch Restriktionsendonukleasespaltung das plasmideigene 29 bp lange Eco RI-Hin dIII Fragment entfernt und an dessen
10 Stelle die DNA Sequenz gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 durch Ligasereaktion eingesetzt wird.
- 15 24. Verfahren zur Herstellung eines Produktionsplasmids gemäß den Ansprüchen 13 bis 17, welches eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 4, 5, 6 oder 7 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß in einen Vektor, vorzugsweise in das Expressionsplasmid pER 103, das für ein Polypeptid codierende Strukturgen mit Hilfe einer Linkersequenz und gegebenenfalls anschließend ein aus pPM 31 isolierter par-Lokus eingefügt wird.
- 20 25. Verfahren zur Herstellung eines Produktionsplasmids gemäß den Ansprüchen 13, 14 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß in ein gemäß Anspruch 24 hergestelltes Produktionsplasmid eine weitere DNA-Sequenz gemäß Anspruch 7 eingefügt wird.
- 25 26. Verfahren zur Herstellung des Produktionsplasmids pER 33, dadurch gekennzeichnet, daß in das Expressionsplasmid pER 103 die für IFN- α A codierende DNA-Sequenz gemäß Anspruch 7 mit Hilfe einer Linkersequenz eingefügt wird.
- 30 27. Verfahren zur Herstellung des Produktionsplasmids parpER 33, dadurch gekennzeichnet, daß in das gemäß Anspruch 26 hergestelltem Produktionsplasmid pER 33 ein aus pPM 31 isolierter par-Lokus eingebracht wird.

28. Verfahren zur Herstellung eines Produktionsplasmids, welches mehrere DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 7 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß in das gemäß Anspruch 26 hergestellte Produktionsplasmid pER 33 eine oder mehrere DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 7 eingebracht werden.
29. Verfahren zur Herstellung des Produktionsplasmids pER 21/1, dadurch gekennzeichnet, daß in das gemäß Anspruch 26 hergestellte Produktionsplasmid pER 33 eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 7 eingebracht wird.
30. Verfahren zur Herstellung von Humaninterferon, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirt mit einem Produktionsplasmid gemäß den Ansprüchen 13 bis 17 zur regulierten Produktion des Humaninterferons transformiert wird.
31. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirt ein Bakterium wie *Escherichia coli* HB 101 verwendet wird.
32. IFN- α A hergestellt gemäß den Ansprüchen 23 oder 24.

Figur 1



Figur 2



Figur 3

2/4

Nukleotidsequenz des 103 bp-Eco RI-Hin dIII-Fragmentes
von pER 103:

Eco RI

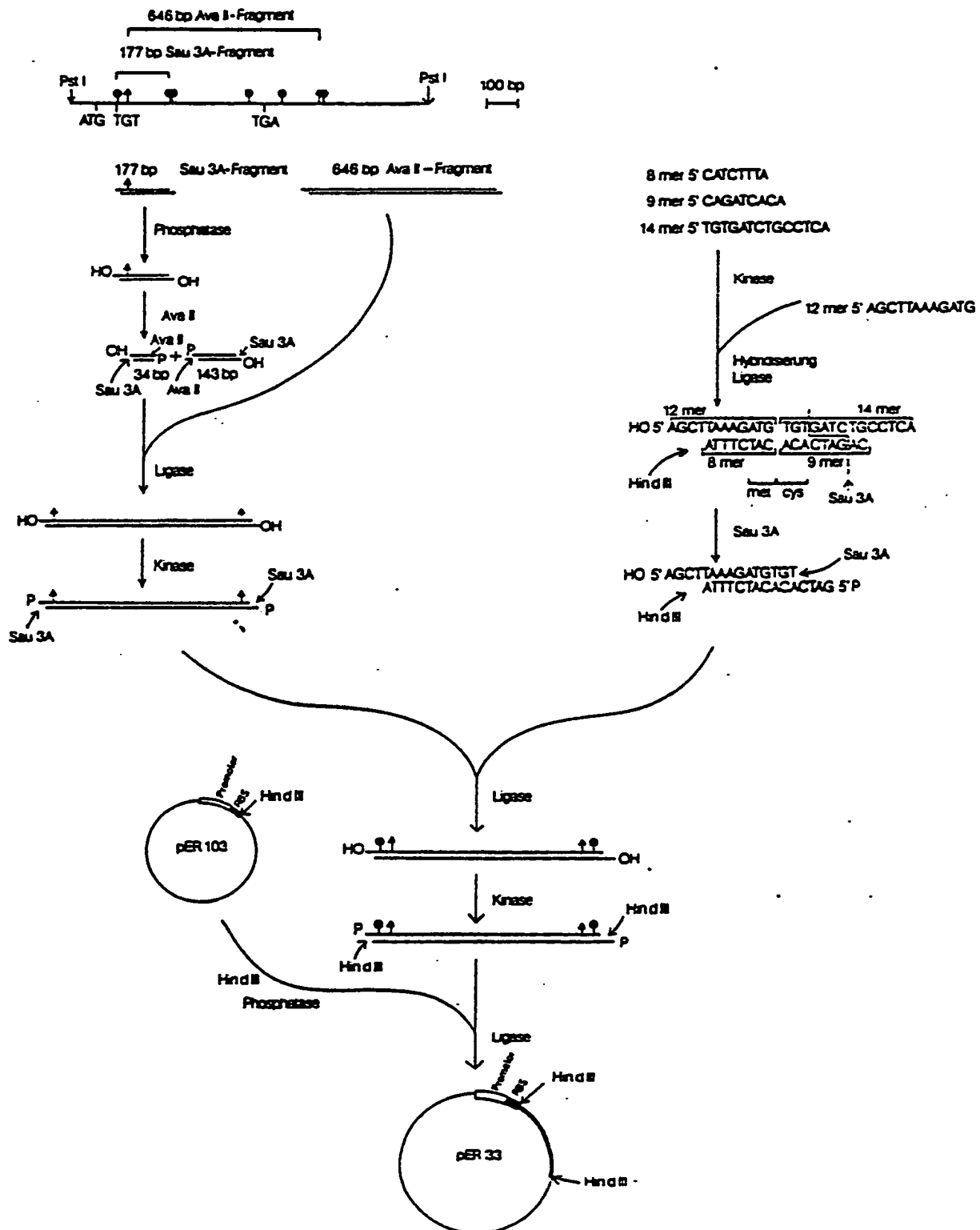
5' AATTCACGCTGATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

————— Promotor —————

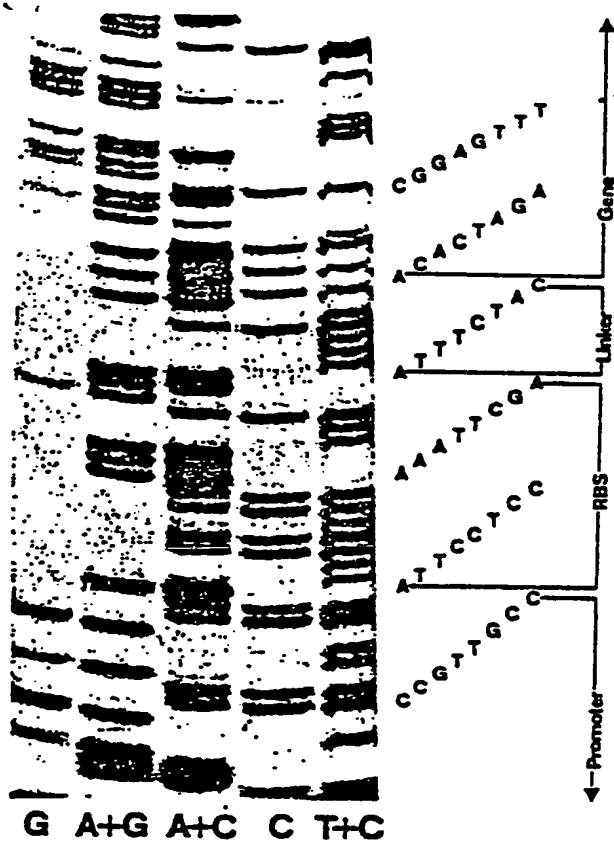
GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTA
CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCTGA
———— Promotor/Operator ————— | <— RBS ————— |
Hin dIII

4/4

Figur 4



Figur 5



Eco RI

5' AATTCACGCTGATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGAC
 3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTG

>————Promotor————<

TTTGCCCTTCGCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAA
 AAACGGAAGCGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTT

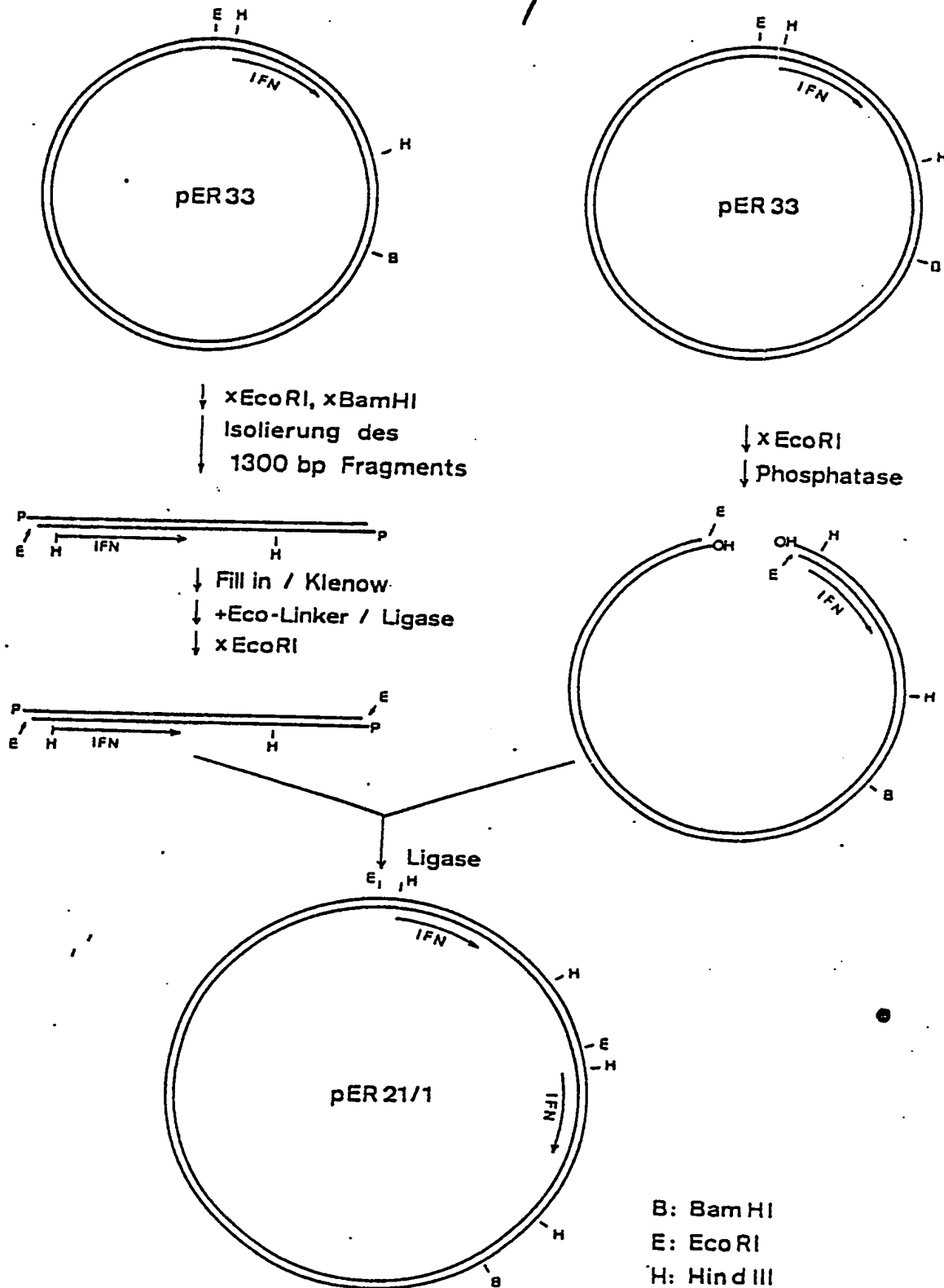
————Promotor/Operator————

CGGTAAGGAGGTTTAAAGCTTAAAGATGTGTGATCTGCCTCAAA...
 GCCATTCTCCAAATTCGAATTTCTACACACTAGACGGAGTTT...

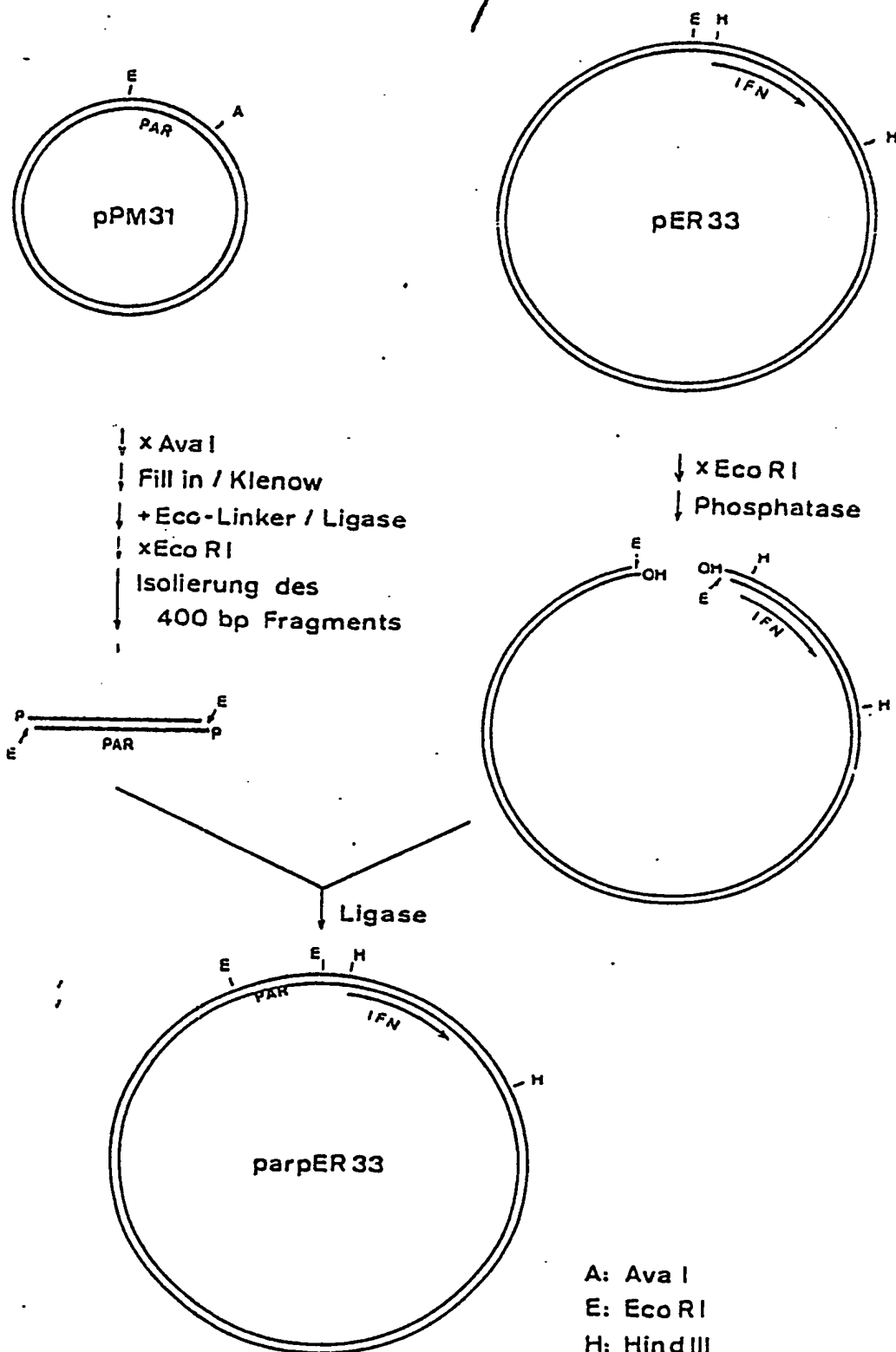
*——RBS——*Linker*——Gen——>>

Figur 6

6/4






Figur 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US88/03409

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC (4): A61K 45/02; B01D 15/08; C07K 15/26 U.S. Class: 210/635, 656; 424/85; 435/803, 811; 530/351, 413, 417														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th>Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">U.S.</td> <td>210/635, 656, 659; 424/85; 435/803, 811 530/351, 413, 416, 417</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	U.S.	210/635, 656, 659; 424/85; 435/803, 811 530/351, 413, 416, 417								
Classification System	Classification Symbols													
U.S.	210/635, 656, 659; 424/85; 435/803, 811 530/351, 413, 416, 417													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 70%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>Tarnowski et. al., "Large Scale Purification of Recombinant Human Leukocyte Interferons", Method in Enzymology, 119, pages 158-166 (1986) see page 163 lines 14-37.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>Bodo, et. al. Characterization of Different Molecular Species in Affinity Purified Recombinant Human Interferon Alpha 2, "The Interferon System" pages 23-27 (1985) see page 25, lines 1-5.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">10-21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>Felix et. al., "Analysis of Different Forms of Recombinant Human Interferons by High-Performance Liquid Chromatography Methods in Enzymology, 119 pages 242-248 (1986) see page 242, lines 11-21.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">10-21</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	Tarnowski et. al., "Large Scale Purification of Recombinant Human Leukocyte Interferons", Method in Enzymology, 119, pages 158-166 (1986) see page 163 lines 14-37.	1-9	X	Bodo, et. al. Characterization of Different Molecular Species in Affinity Purified Recombinant Human Interferon Alpha 2, "The Interferon System" pages 23-27 (1985) see page 25, lines 1-5.	10-21	X	Felix et. al., "Analysis of Different Forms of Recombinant Human Interferons by High-Performance Liquid Chromatography Methods in Enzymology, 119 pages 242-248 (1986) see page 242, lines 11-21.	10-21
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
A	Tarnowski et. al., "Large Scale Purification of Recombinant Human Leukocyte Interferons", Method in Enzymology, 119, pages 158-166 (1986) see page 163 lines 14-37.	1-9												
X	Bodo, et. al. Characterization of Different Molecular Species in Affinity Purified Recombinant Human Interferon Alpha 2, "The Interferon System" pages 23-27 (1985) see page 25, lines 1-5.	10-21												
X	Felix et. al., "Analysis of Different Forms of Recombinant Human Interferons by High-Performance Liquid Chromatography Methods in Enzymology, 119 pages 242-248 (1986) see page 242, lines 11-21.	10-21												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">08 November 1988</div> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05 DEC 1988</div> </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"> International Searching Authority <div style="text-align: center;">ISA/US</div> </td> <td style="vertical-align: top;"> Signature of Authorized Officer <div style="text-align: center;">  ERNEST G. THERKORN </div> </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">08 November 1988</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05 DEC 1988</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center;">ISA/US</div>	Signature of Authorized Officer <div style="text-align: center;">  ERNEST G. THERKORN </div>								
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">08 November 1988</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05 DEC 1988</div>													
International Searching Authority <div style="text-align: center;">ISA/US</div>	Signature of Authorized Officer <div style="text-align: center;">  ERNEST G. THERKORN </div>													

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

X

Nakagawa et. al. "Characterization of Three Species of E. Coli-Derived Human Leukocyte Interferon A Separated by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography" Journal of Interferon Research 7, pages 285-299 (1987) see page 285, lines 1-13.

10-21

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers _____, because they relate to subject matter ¹² not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out ¹³, specifically:

3. ☐ Claim numbers _____, because they are dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.